

STN Karlsruhe

L6 ANSWER 1 OF 1 WPIDS COPYRIGHT 2006 THE THOMSON CORP on STN  
AB DE 10235270 A UPAB: 20040310

NOVELTY - Cells (A) that secrete enantiomerically pure (R)- alpha -lipoic acid (I) into the culture medium and overexpress the lipoic acid synthase (lipA) gene, are new.

DETAILED DESCRIPTION - INDEPENDENT CLAIMS are also included for the following:

- (1) plasmid that contains the lipA gene under control of a promoter;
- (2) method for preparing (A) by introducing the plasmid of (1) into a starting cell; and
- (3) method for producing (I) by culturing (A).

ACTIVITY - Antidiabetic; Ophthalmological; Cardiant; Neuroprotective.  
No biological data given.

MECHANISM OF ACTION - (I) Is an antioxidant, so protects against oxidative stress, while its reduced form ( alpha -dihydrolipoic acid) regenerates other antioxidants (ascorbic acid or tocopherols) in the body.

USE - (I) Is an essential cofactor for some multienzyme complexes and is used in pharmaceuticals and food supplements e.g. for treatment and prevention of type II diabetes mellitus and its complications (polyneuropathy, cataract and cardiovascular disorders).

ADVANTAGE - The method provides enantiomerically pure (I), eliminating the need for resolution of the racemic synthetic compound and avoiding the side effects associated with the (S) form.  
Dwg.0/2

**This Page Blank (uspto)**



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 102 35 270 A1 2004.02.12

(12)

## Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: 102 35 270.4  
(22) Anmeldetag: 01.08.2002  
(43) Offenlegungstag: 12.02.2004

(51) Int Cl.<sup>7</sup>: **C12N 1/19**  
C12N 1/21, C12N 15/54, C12P 17/00  
// (C12N 1/19, C12R 1:19)(C12P 17/00, C12R 1:19)

(71) Anmelder:  
Consortium für elektrochemische Industrie  
GmbH, 81379 München, DE

(72) Erfinder:  
Daßler, Tobias, Dr. Dipl.-Bio., 81825 München, DE;  
Maier, Thomas, Dr. Dipl.-Bio., 85221 Dachau, DE

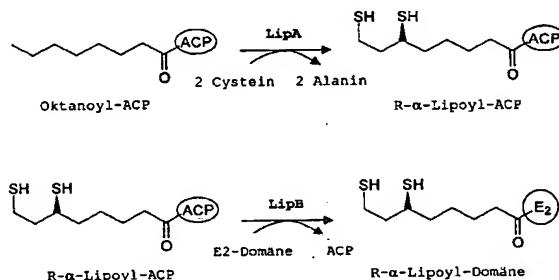
Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: Zellen, die R-alpha-Liponsäure sekretieren und Verfahren zur fermentativen Herstellung der R-alpha-Liponsäure

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Zellen und ein Verfahren zur Herstellung von R- $\alpha$ -Liponsäure mittels Fermentation.

Der erfindungsgemäße Wirtsorganismenstamm, der zur fermentativen Herstellung von R- $\alpha$ -Liponsäure geeignet ist, ist dadurch gekennzeichnet, daß er ein Gen codierend für eine Liponsäure-Synthase überexprimiert und die gebildete R- $\alpha$ -Liponsäure in freier Form in das Kulturmedium ausscheidet.



## Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft Zellen, die R- $\alpha$ -Liponsäure sekretieren und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung der R- $\alpha$ -Liponsäure unter Verwendung dieser Zellen.

## Stand der Technik

[0002] R- $\alpha$ -Liponsäure ist in einer Vielzahl von Pro- und Eukaryonten ein essentieller Cofaktor bestimmter Multienzymkomplexe. Dabei ist die R- $\alpha$ -Liponsäure jeweils kovalent an die  $\epsilon$ -Aminogruppe eines spezifischen Lysin-Rests des entsprechenden Enzyms gebunden. Auf diese Weise ist die R- $\alpha$ -Liponsäure ein Teil der E2-Untereinheit der Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) [EC 2.3.1.12] bzw. der  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase (KGDH) [EC 2.3.1.61] und spielt dort als Redoxpartner und Acylgruppenüberträger eine entscheidende Rolle bei der oxidativen Decarboxylierung von  $\alpha$ -Ketosäuren. Außerdem fungiert Liponsäure als Aminomethyl-Carrier in Glycin-Cleavage Enzymsystemen.

[0003]  $\alpha$ -Liponsäure ist ein optisch aktives Molekül mit einem Chiralitätszentrum am Kohlenstoffatom C6. Dabei stellt die R-Konfiguration der  $\alpha$ -Liponsäure das natürlich vorkommende Enantiomer dar. Nur diese Form zeigt physiologische Aktivität als Cofaktor der entsprechenden Enzyme.  $\alpha$ -Liponsäure kann sowohl in einer oxidierten (5-[1,2]-Dithiolan-3-yl-Pentansäure) als auch in einer reduzierten Form (6,8-Dimercapto-Oktansäure) vorkommen. Im Folgenden sind unter der Bezeichnung " $\alpha$ -Liponsäure" beide Formen sowie die jeweiligen Salze der  $\alpha$ -Liponsäure, wie z. B. das Calcium-, Kalium-, Magnesium-, Natrium- oder das Ammoniumsalz zu verstehen.

[0004] Die Biosynthese von R- $\alpha$ -Liponsäure wurde besonders an dem Bakterium *Escherichia coli* intensiv untersucht (s. Fig. 1). Hier dient Oktansäure, die an das Acyl-Carrier-Protein (ACP) kovalent gebunden ist, als spezifische Vorstufe bei der Liponsäure-Synthese. In einer komplexen Reaktion werden zwei Schwefelatome auf die derart aktivierte Oktansäure (Oktanoyl-ACP) übertragen, wobei R- $\alpha$ -Lipoyl-ACP entsteht. Diese Reaktion wird von der Sulfurtransferase Liponsäure-Synthase [EC 2.8.1.-], dem lipA-Genprodukt, katalysiert. Als Schwefeldonor dient dabei letztendlich die Aminosäure L-Cystein. Der anschließende Transfer der R- $\alpha$ -Liponsäure von R- $\alpha$ -Lipoyl-ACP auf die E2-Untereinheit der  $\alpha$ -Ketosäure-Dehydrogenasen wird von der Lipoyl-Protein-Ligase B [EC 6.-.-.-], dem lipB-Genprodukt, katalysiert, ohne dass dabei jedoch R- $\alpha$ -Lipoyl-ACP oder R- $\alpha$ -Liponsäure als freie Zwischenprodukte auftreten (Miller et al., 2000, *Biochemistry* 39: 15166-15178).

[0005] Über die Biosynthese von R- $\alpha$ -Liponsäure in Eukaryonten ist wenig bekannt. Es wird aber vermutet, dass die R- $\alpha$ -Liponsäure-Synthese sowie der Transfer auf die entsprechenden Enzyme in den Mitochondrien eukaryontischer Zellen auf ähnliche Weise wie in Bakterien erfolgt.

[0006] Neben ihrer Relevanz als essentieller Bestandteil von Enzymen mit einer zentralen Rolle im Stoffwechsel, wurde schon früh die Bedeutung der  $\alpha$ -Liponsäure für die Pharmakotherapie sowie für die Nahrungsmittelergänzung (Nutraceutical) erkannt:  $\alpha$ -Liponsäure besitzt aufgrund ihrer beiden Thiolgruppen eine ausgeprägte Wirksamkeit als Antioxidans und kann deshalb den Organismus vor schädlichen Prozessen, die durch oxidativen Stress induziert werden, schützen. Außerdem ist  $\alpha$ -Dihydroliponsäure, die reduzierte Form der  $\alpha$ -Liponsäure, aufgrund ihrer Eigenschaft als starkes Reduktionsmittel in der Lage, andere oxidierte natürliche Antioxidationsmittel im Körper wie Ascorbinsäure oder  $\alpha$ -Tocopherol direkt oder indirekt zu regenerieren oder bei deren Mangel diese auch zu ersetzen. Entsprechend kommt der  $\alpha$ -Liponsäure im Zusammenspiel mit Ascorbinsäure,  $\alpha$ -Tocopherol und Glutathion, dem sogenannten "Netzwerk der Antioxidantien", eine zentrale Bedeutung zu.  $\alpha$ -Liponsäure wird außerdem zur Prävention und Bekämpfung von Diabetes mellitus Typ II und dessen Folgeschäden, wie z. B. Polyneuropathie, Cataract oder Kardiovaskularleiden eingesetzt.

[0007] Die unterschiedliche biologische Aktivität beider Enantiomere der  $\alpha$ -Liponsäure ist derzeit Gegenstand intensiver Untersuchungen, wobei sich allerdings immer mehr herauskristallisiert, dass die Applikation des reinen R-Enantiomers der  $\alpha$ -Liponsäure deutliche Vorteile gegenüber der S-Form aufweist. So wurde im in vitro-Versuch gezeigt, dass nur die natürliche R- $\alpha$ -Liponsäure zur Bildung funktioneller  $\alpha$ -Ketosäure-Dehydrogenasen führt. Das S-Enantiomer hatte dagegen sogar einen inhibierenden Effekt auf die Stimulierung der Enzymaktivität durch R- $\alpha$ -Liponsäure. Die Reduktion von  $\alpha$ -Liponsäure und damit die Regeneration der antioxidativ wirksamen  $\alpha$ -Dihydroliponsäure in den Mitochondrien ist für die Zelle von essentieller Bedeutung. Die mitochondriale NADH-abhängige Lipoamid-Reduktase von Säugern zeigt mit dem R-Enantiomer eine fast 20-fach höhere Aktivität als mit der S-Form. Des weiteren hat R- $\alpha$ -Liponsäure verglichen mit dem S-Enantiomer einen deutlich stärkeren Effekt auf die Insulin-vermittelte Glucose-Aufnahme und den Glucose-Metabolismus von Skelettmuskelzellen insulinresistenter Ratten. Im Tierversuch zeigte die R-Form außerdem einen antiphlogistischen Effekt, während die S-Form eher eine analgetische Wirkung hatte. Um unerwünschte Nebeneffekte zu vermeiden, ist es daher äußerst wünschenswert,  $\alpha$ -Liponsäure jeweils nur in der enantiomerenreinen Form zu applizieren.

[0008] Derzeit erfolgt die großtechnische Herstellung von  $\alpha$ -Liponsäure ausschließlich mittels chemischer Verfahren, wobei immer das Razemat aus R- und S-Form als Endprodukt gebildet wird (Y-adav et al., 1990, J.

Sci. Ind. Res. 49: 400-409). Zur Gewinnung von enantiomerenreiner R- $\alpha$ -Liponsäure wurden verschiedene Verfahren entwickelt. Beispielsweise kann das Razemat der  $\alpha$ -Liponsäure oder eines der Syntheseintermediate entweder chemisch mittels chiraler Hilfssubstanzen (Walton et al., 1954, J. Amer. Chem. Soc. 76: 4748; DE 4137773) oder enzymatisch (Adger et al., 1995, J. Chem. Soc., Chem. Commun.: 1563-1564) aufgespalten werden. In anderen Verfahren unterbleibt die Entstehung eines Razemats aufgrund eines enantioselektiven Syntheseschritts, wobei das neue Chiralitätszentrum entweder chemisch (DE 3629116; DE 19533881; Bringmann et al., 1999, Z. Naturforsch. 54b: 655-661; DE 10036516) oder durch eine stereospezifische Biotransformation mittels Mikroorganismen eingeführt werden kann (Gopalan und Jacobs, 1989, Tetrahedron Lett. 30: 5705-5708; Dasaradhi et al., 1990, J. Chem. Soc., Chem. Commun.: 729-730; DE 10056025). Andere Prozesse wiederum starten die chemische Synthese von enantiomerenreiner  $\alpha$ -Liponsäure mit einem natürlich vorkommenden chiralen Edukt wie z. B. S-Maleinsäure oder D-Mannitol (Brookes und Golding, 1988, J. Chem. Soc. Perkin Trans. I: 9-12; Rama Rao et al., 1987, Tetrahedron Lett. 28, 2183-2186). Wegen z. T. aufwendiger Syntheseschritte, geringer Ausbeuten und hoher Materialkosten sind alle bekannten Methoden zur Herstellung von enantiomerenreiner R- $\alpha$ -Liponsäure derzeit nicht wirtschaftlich.

[0009] Die großtechnische Herstellung vieler niedermolekularer Naturstoffe, wie z.B. Antibiotika, Vitamine oder Aminosäuren erfolgt heute oftmals mittels eines fermentativen Verfahrens unter Verwendung verschiedener Stämme von Mikroorganismen.

#### Aufgabenstellung

[0010] Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, Zellen zur Verfügung zu stellen, die enantiomerenreine R- $\alpha$ -Liponsäure in ein Kulturmedium sekretieren.

[0011] Diese Aufgabe wird gelöst durch Zellen, die dadurch gekennzeichnet sind, dass sie ein Liponsäure-Synthase-Gen (lipA-Gen) überexprimieren.

[0012] Unter einer Überexpression ist im Sinne der vorliegenden Erfindung vorzugsweise zu verstehen, dass das Liponsäure-Synthase-Gen im Vergleich zur jeweiligen Wildtyp-Zelle, aus der das Liponsäure-Synthase-Gen gewonnen wurde, mindestens um den Faktor 2, bevorzugt mindestens um den Faktor 5 vermehrt exprimiert wird.

[0013] Vorzugsweise handelt es sich bei dem Liponsäure-Synthase-Gen um ein Gen mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 oder um eine funktionelle Variante dieses Gens.

[0014] Unter einer funktionellen Variante ist im Sinne der vorliegenden Erfindung eine DNA-Sequenz zu verstehen, die sich durch Deletion, Insertion oder Substitution von Nukleotiden aus der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Sequenz ableitet, wobei die enzymatische Aktivität der durch das Gen codierten Liponsäure-Synthase erhalten bleibt.

[0015] Um eine Überexpression des lipA-Gens in der Zelle zu erreichen, kann die Kopienzahl des lipA-Gens in einer Zelle erhöht sein und/oder es kann die Expression des lipA-Gens, vorzugsweise durch geeignete Promotoren, gesteigert sein.

[0016] Durch die Überexpression eines lipA-Gens ist die Liponsäure-Synthase-Aktivität der Zelle jeweils um mindestens den gleichen Faktor gesteigert.

[0017] Vorzugsweise überexprimiert eine erfindungsgemäße Zelle ein Liponsäure-Synthase-Gen, das für ein Protein umfassend die Sequenz ID NO: 2 oder funktionelle Varianten mit einer Sequenzhomologie zu SEQ ID NO: 2 größer 40 %, codiert.

[0018] Vorzugsweise ist die Sequenzhomologie zu SEQ ID NO: 2 größer 60 %, besonders bevorzugt ist die Sequenzhomologie zu SEQ ID NO: 2 größer 80 %.

[0019] In der vorliegenden Erfindung beziehen sich alle erwähnten Homologiewerte auf Ergebnisse, die mit dem Algorithmus BESTFIT (GCG Wisconsin Package, Genetics Computer Group (GLG) Madison, Wisconsin) erhalten werden.

[0020] Die Erhöhung der Kopienzahl eines lipA-Gens in einer Zelle kann mit dem Fachmann bekannten Methoden erreicht werden. So kann zum Beispiel ein lipA-Gen in einen Plasmid-Vektor mit mehrfacher Kopienzahl pro Zelle (z.B. pUC19, pBR322, pACYC184 für Escherichia coli) kloniert und in die Zelle eingebracht werden. Alternativ kann ein lipA-Gen mehrfach ins Chromosom einer Zelle integriert werden. Als Integrationsverfahren können die bekannten Systeme mit temperenten Bakteriophagen, integrative Plasmide oder die Integration über homologe Rekombination genutzt werden (z.B. Hamilton et al., 1989, J. Bacteriol. 171: 4617-4622).

[0021] Bevorzugt ist die Erhöhung der Kopienzahl durch Klonierung eines lipA-Gens in einen Plasmid-Vektor unter Kontrolle eines Promotors. Besonders bevorzugt ist die Erhöhung der Kopienzahl in Escherichia coli durch Klonierung eines lipA-Gens in ein pUC-Derivat wie z. B. pASK-IBA3 (IBA, Institut für Bioanalytik, Göttingen). Die Erfindung betrifft somit auch ein Plasmid dadurch gekennzeichnet, dass es ein lipA-Gen unter funktioneller Kontrolle eines Promotors enthält.

[0022] Als Kontrollregion für die Expression eines plasmid-codierten lipA-Gens kann die natürliche Promotor- und Operatorregion des lipA-Gens dienen, die verstärkte Expression eines lipA-Gens kann jedoch insbeson-

dere auch mittels anderer Promotoren erfolgen. Entsprechende Promotorsysteme, die entweder eine andauernde oder eine kontrollierte, induzierbare Expression des Liponsäure-Synthase-Gens ermöglichen wie beispielsweise in *Escherichia coli* der konstitutive GAPDH-Promotor des gapA-Gens oder die induzierbaren lac-, tac-, trc-, lambda-, ara oder tet-Promotoren, sind dem Fachmann bekannt (Makrides S. C., 1996, Microbiol. Rev. 60: 512-538). Solche Konstrukte können in an sich bekannter Weise auf Plasmiden oder chromosomal verwendet werden.

[0023] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform für die Klonierung eines lipA-Gens wird ein Plasmid verwendet, das bereits einen Promotor zur verstärkten Expression enthält, wie beispielsweise das induzierbare tet-Promotor/Repressorsystem von *Escherichia coli*.

[0024] Des weiteren kann eine verstärkte Expression dadurch erreicht werden, daß Translationsstartsignale, wie z. B. die Ribosomenbindestelle oder das Startcodon des Gens, in optimierter Sequenz auf dem jeweiligen Konstrukt vorhanden sind, oder dass gemäß der "codon usage" seltene Codons gegen häufiger vorkommende Codons ausgetauscht werden.

[0025] Bevorzugt enthalten erfindungsgemäße Zellen ein Plasmid mit einem lipA-Gen sowie den genannten Modifikationen der Regulationssignale.

[0026] Die Klonierung eines lipA-Gens in einen Plasmid-Vektor erfolgt beispielsweise durch spezifische Amplifikation eines lipA-Gens mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion unter Einsatz von spezifischen Primern, die das komplette lipA-Gen erfassen, und anschließende Ligation mit Vektor-DNS-Fragmenten.

[0027] Erfindungsgemäße Zellen, die eine gegenüber einer Ausgangszelle erhöhte Expression eines lipA-Gens und verbunden damit eine gesteigerte Liponsäure-Synthase Aktivität aufweisen, können mit Standardtechniken der Molekularbiologie aus einer Ausgangszelle erzeugt werden.

[0028] In einer Vielzahl von Zellen konnten Liponsäure-Synthase-Gene identifiziert werden. Erfindungsgemäße Zellen lassen sich somit vorzugsweise aus Zellen von pro- oder eukaryontischen Organismen herstellen, die in der Lage sind, R- $\alpha$ -Liponsäure selbst zu synthetisieren (Ausgangszelle), die rekombinanten Verfahren zugänglich sind und die durch Fermentation kultivierbar sind. Auch pflanzliche oder tierische Zellen, die in Zellkultur züchtbar sind, sind somit zur Herstellung erfindungsgemäßer Zellen geeignet.

[0029] Bevorzugt handelt es sich bei den erfindungsgemäßen Zellen um Mikroorganismen, wie zum Beispiel Hefe- oder Bakterienstämme. Besonders bevorzugt handelt es sich um Bakterienstämme aus der Familie der Enterobacteriaceae, ganz besonders bevorzugt um Stämme der Art *Escherichia coli*.

[0030] Durch eine gängige Transformationsmethode (z.B. Elektroporation) werden die lipA-haltigen Plasmide in eine Ausgangszelle eingebracht und beispielsweise mittels Antibiotika-Resistenz auf plasmid-tragende Klone selektiert.

[0031] Die Erfindung betrifft somit auch Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen Zelle, dadurch gekennzeichnet, dass in eine Ausgangszelle ein erfindungsgemäßes Plasmid eingebracht wird.

[0032] Eine weitere Aufgabe der Erfindung war es, ein Fermentationsverfahren zur Verfügung zu stellen, welches die Herstellung enantiomerenreiner R- $\alpha$ -Liponsäure ermöglicht.

[0033] Diese Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass eine erfindungsgemäße Zelle in einem Kulturmedium kultiviert wird, wobei die Zelle enantiomerenreine R- $\alpha$ -Liponsäure in freier Form in das Kulturmedium ausscheidet und die enantiomerenreine R- $\alpha$ -Liponsäure von dem Kulturmedium abgetrennt wird.

[0034] Die Gewinnung von R- $\alpha$ -Liponsäure aus dem Kulturmedium kann nach dem Fachmann bekannten Verfahren, wie Zentrifugation des Mediums zur Abtrennung der Zellen und durch anschließende Extraktion oder Präzipitation des Produkts erfolgen.

[0035] Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren handelt es sich um das erste Verfahren, bei dem die gesamte Synthese von R- $\alpha$ -Liponsäure ausschließlich in einem Fermentationsprozess mit lebenden Zellen erfolgt. Der Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens gegenüber den herkömmlichen chemischen Prozessen liegt in der enantiomerspezifischen Biosynthese von R- $\alpha$ -Liponsäure, weshalb eine aufwendige Razemattrennung während oder am Ende der Synthesekette entfällt. Des weiteren ist bei dem erfindungsgemäßen Herstellungsverfahren für R- $\alpha$ -Liponsäure die Umweltbelastung im Vergleich zur chemischen Synthesewesentlich geringer.

[0036] Aus physiologischen und biochemischen Daten geht hervor, dass Liponsäure in Wildtyp-Zellen nahezu ausschließlich in gebundener Form vorkommt, da bereits die Synthese der R- $\alpha$ -Liponsäure vollständig proteingebunden erfolgt (vgl. Fig. 1) (Herbert und Guest, 1975, Arch. Microbiol. 106: 259-266; Miller et al., 2000, Biochemistry 39: 15166-15178). Überraschenderweise wurde jedoch im Rahmen der vorliegenden Erfindung gefunden, dass die Überexpression eines Liponsäure-Synthase-Gens zur Anhäufung freier, enantiomerenreiner R- $\alpha$ -Liponsäure im Kulturmedium des Wirtsorganismus führt. Dies wiederum erlaubt eine einfache Isolierung des Produkts aus dem Kulturmedium nach Abtrennung der Biomasse, ohne dass die Zellen zuvor aufgebrochen werden müssen, bzw. ohne dass die R- $\alpha$ -Liponsäure durch einen aufwendigen und verlustreichen Hydrolyseschritt vom daran gebundenen Trägerprotein (ACP oder die E2-Untereinheit der  $\alpha$ -Ketosäure-Dehydrogenasen) abgespalten werden muss.

[0037] Die Kultivierung der erfindungsgemäßen Zellen zur Produktion von R- $\alpha$ -Liponsäure erfolgt vorzugs-

weise in einem aus der Literatur bekannten Minimalsalzmedium (Herbert und Guest, 1970, Meth. Enzymol. 18A, 269-272).

[0038] Als Kohlenstoffquelle können prinzipiell alle verwertbaren Zucker, Zuckeralkohole oder organische Säuren verwendet werden. Des weiteren können kurzkettige Fettsäuren mit einer Kettenlänge von C2-C8, bevorzugt mit einer Kettenlänge von C6-C8 (Hexan- bzw. Oktansäure) als spezifische Vorstufen für die  $\alpha$ -Liponsäure-Synthese dem Medium zugesetzt werden. Dabei beträgt die Konzentration der zugesetzten Kohlenstoffquelle vorzugsweise 1-30 g/l.

[0039] Die Inkubation der erfindungsgemäßen Zellen erfolgt vorzugsweise unter aeroben Kultivierungsbedingungen über einen Zeitraum von 16 – 150 h und im Bereich der für die jeweiligen Zellen optimalen Wachstumstemperatur.

[0040] Als optimaler Temperaturbereich werden 15 – 55 °C bevorzugt. Besonders bevorzugt ist eine Temperatur zwischen 30 und 37 °C.

[0041] Der Nachweis und die Quantifizierung der im erfindungsgemäßen Verfahren produzierten R- $\alpha$ -Liponsäure erfolgt beispielsweise mittels eines Bioassays unter Verwendung eines liponsäureauxotrophen Indikatorstammes (lipA-Mutante). Diese Art der turbidimetrischen Quantifizierung von R- $\alpha$ -Liponsäure ist aus der Literatur bekannt (Herbert und Guest, 1970, Meth. Enzymol. 18A, 269-272). Der im Rahmen der vorliegenden Erfindung verwendete Indikatorstamm W1485lip2 (ATCC 25645), würde allerdings auch ohne supplementierte R- $\alpha$ -Liponsäure wachsen, wenn das Medium neben Glucose auch noch Acetat und Succinat enthält. Um ein falschpositives Wachstum des Indikatorstammes im Bioassay bei der Bestimmung der produzierten R- $\alpha$ -Liponsäure zu vermeiden – beispielsweise verursacht durch einen Eintrag von Glucose und den vom Produktionsstamm zusätzlich zur R- $\alpha$ -Liponsäure ausgeschiedenen Säuren Acetat und Succinat – erfolgt bereits die Anzucht des R- $\alpha$ -Liponsäure-Produzenten bevorzugt mit Succinat als einziger Kohlenstoffquelle. Dieser Stamm wird mit dem Kulturüberstand einer erfindungsgemäßen Zellanzucht supplementiert; anhand des Wachstums des Indikatorstammes kann dann der Liponsäure-Gehalt im Kulturmedium bestimmt werden.

[0042] Die folgenden Beispiele dienen der weiteren Erläuterung der Erfindung. Der Bakterienstamm Escherichia coli W3110/pASK-IBA3-lipA, der für die Ausführung der Beispiele verwendet wurde, wurde bei der DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, D-38142 Braunschweig) unter der Nummer DSM 15104 gemäß Budapester Vertrag, hinterlegt.

#### Beispiel 1: Konstruktion des Vektors pASK-IBA3-lipA

##### A. Amplifizierung des lipA-Gens

[0043] Das lipA-Gen aus E. coli wurde mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) unter Verwendung der Pwo-DNA-Polymerase nach gängiger, dem Fachmann bekannter Praxis amplifiziert. Als Matrize diente die chromosomale DNA des E. coli-Wildtypstammes W3110 (ATCC 27325). Als Primer wurden die phosphorothioatgeschützten Oligonukleotide lipAS1, und lipAS2 mit folgenden Sequenzen verwendet:

lipAS1: (SEQ ID NO: 3)

5'- GAT CGA GGT CTC GAA TGA GTA AAC CCA TTG TGA TG -3'

BsaI

lipAS2: (SEQ ID NO: 4)

5'- GAT CGA GGT CTC GGC GCT CTT AAC TTC CAT CCC TTT CG -3'

BsaI

[0044] Das bei der PCR erhaltene DNA-Fragment mit einer Länge von ca. 1 kb wurde anschließend mittels eines DNA-Adsorptionssäulchens des QIAprep Spin Miniprep Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben gereinigt.

##### B. Klonierung des lipA-Gens in den Vektor pASK-IBA3

[0045] In das PCR-Fragment wurden über die Primer-Sequenzen Schnittstellen für die Restriktionsendonuclease BsaI (Erkennungssequenz in den Oligonukleotiden unterstrichen) eingeführt. Das gereinigte PCR-Fragment wurde mit der Restriktionsendonuclease BsaI unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen geschnitten, anschließend über ein Agarosegel aufgetrennt und dann mittels des GENECLAN Kits (BIO 101 Inc., La Jolla, Kalifornien, USA) nach Herstellerangaben aus dem Agarosegel isoliert.

[0046] Der Klonierungs- und Expressionsvektor pASK-IBA3 (IBA, Institut für Bioanalytik, Göttingen) enthält verschiedene genetische Elemente, die eine kontrollierte Expression eines beliebigen Gens erlauben. Es handelt sich dabei um einen high-copy Vektor mit einem von der pUC-Plasmidfamilie abgeleiteten Replikationsursprung. Die Expression des klonierten Gens wird durch den Tet-Repressor unterdrückt und kann durch (Rnhydro)Tetracyclin induziert werden. Des weiteren enthält der Vektor noch die sogenannte Strep-tag II-Sequenz, welche bei der Klonierung direkt an das letzte Codon des klonierten Gens anfusioniert wird. Die auf diese Weise entstandene Genfusion codiert nun für ein Protein, das C-terminal um die Aminosäuresequenz des Strep-tag II (SAWSHPQFEK; SEQ ID NO: 5) verlängert ist. Mit Hilfe dieses Anhängsels ist eine einfache Affinitätsreinigung des Proteins möglich, da das StrepTagII-Peptid eine Bindung an Streptavidin-Säulen vermittelt.

[0047] Zur Klonierung des lipA-Gens wurde der Vektor pASK-IBA3 mit dem Restriktionsenzym Eco31I (Iso-schizomer von BsaI) unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen geschnitten, anschließend durch Behandlung mit Alkalischer Phosphatase an den 5'-Enden dephosphoryliert und dann wie das PCR-Fragment mittels der GENECLAN-Methode gereinigt.

[0048] Die Ligation des PCR-Fragments mit dem geschnittenen und dephosphorylierten Vektor erfolgte nach Herstellerangaben unter Verwendung der T4-DNA-Ligase. Die Transformation von E. coli-Zellen des Stammes DH5a mit dem Ligationsansatz wurde mittels Elektroporation in einer dem Fachmann bekannten Art und Weise durchgeführt. Der Transformationsansatz wurde auf LB-Ampicillin-Agarplatten (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, 15 g/l Agar, 100 mg/l Ampicillin) ausgebracht und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

[0049] Die gewünschten Transformanten wurden nach einer Plasmidisolierung mittels eines QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) durch eine Restriktionsanalyse identifiziert.

[0050] Im dem auf diese Weise erhaltenen Plasmid pASK-IBA3-lipA (Fig. 2) ist wie oben beschrieben an das letzte Codon des lipA-Gens die Strep-tag II-Sequenz anfusioniert. Diese C-terminale Verlängerung ist allerdings für die Erfindung nicht relevant, da sie auf die Aktivität des LipA-Proteins und damit auf die R- $\alpha$ -Liponsäure-Produktionsleistung des erfindungsgemäßen Wirtsorganismus keinen signifikanten Einfluss hat.

#### Beispiel 2: Herstellung eines Produzenten von R- $\alpha$ -Liponsäure

[0051] Das in Beispiel 1 beschriebene Plasmid pASK-IBA3-lipR wurde mittels Elektroporation in den E. coli-Stamm W3110 transformiert und nach Selektion auf LB-Agarplatten mit 100 mg/l Ampicillin wurde das Plasmid aus einer der Transformanten reisoliert, mit Restriktionsendonucleasen gespalten und überprüft. Mit dem Kontrollplasmid pASK-IBA3 wurde in analoger Weise verfahren.

#### Beispiel 3: Fermentative Produktion von R- $\alpha$ -Liponsäure

[0052] Für die fermentative Produktion von R- $\alpha$ -Liponsäure wurde der Stamm W3110/pASK-IBA3-lipA verwendet. Als Vergleich diente der Stamm W3110 mit dem Plasmid pASK-IBA3, der unter exakt denselben Bedingungen kultiviert wurde.

[0053] Als Vorkultur für die Produktionsanzucht wurden zunächst 5 ml LB-Flüssigmedium, das 100 mg/l Ampicillin enthielt, mit dem jeweiligen Stamm beimpft und für 16 h bei 37 °C und 160 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und zweimal mit dem entsprechenden Volumen steriler Saline (0,9 % NaCl) gewaschen. Mit den auf diese Weise vorbereiteten Zellen wurden schließlich 15 ml BS-Medium (7 g/l  $K_2HPO_4$ ; 3 g/l  $K_2HPO_4$ ; 1 g/l  $(NH_4)_2SO_4$ ; 0,1 g/l  $MgSO_4 \times 7 H_2O$ ; 0,5 g/l  $Na_3Citrat \times 3 H_2O$ ; 0,2% säurehydrolysiertes Casein (vitaminfrei); 13,5 g/l  $Na_2Succinat \times 6 H_2O$ ; pH 6,8 mit HCl eingestellt), das außerdem 100 mg/l Ampicillin enthielt, im Verhältnis 1:100 angeimpft. Die Inkubation der Produktionskulturen erfolgte bei 37 °C und 160 rpm auf einem Schüttler für 48 h. Die Expression des Liponsäure-Synthase-Gens wurde durch Zugabe von 0,2 mg/l Anhydrotetracyclin nach ca. 4 h Inkubation induziert. Nach 24 h und 48 h wurden Proben entnommen und die Zellen durch Zentrifugation vom Kulturmedium abgetrennt. Die darin enthaltene R- $\alpha$ -Liponsäure wurde mittels des bekannten turbidimetrischen Bioassays (Herbert und Guest, 1970, Meth. Enzymol. 18A, 269-272) quantifiziert. Tabelle 1 zeigt die erzielten Gehalte freier R- $\alpha$ -Liponsäure im jeweiligen Kulturüberstand:



Tabelle 1

Stamm	R- $\alpha$ -Liponsäure [ $\mu\text{g/l}$ ]	
	24 h	48 h
W3110 / pASK-IBA3-lipA	7,0	10,0
W3110 / pASK-IBA3	0	0

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Consortium fuer elektrochemische Industrie GmbH

<120> Zellen, die R-alpha-Liponsaeure sekretieren und  
Verfahren zur fermentativen Herstellung der  
R-alpha-Liponsaeure

&lt;130&gt; CO10207 / P

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 5

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 966

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Escherichia coli

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(963)

&lt;300&gt;

&lt;301&gt; Reed, Kelynn E.

Cronan Jr., John E.

<302> Lipoic Acid Metabolism in Escherichia coli: Sequencing  
and Functional Characterization of the lipA and lipB  
Genes

&lt;303&gt; J. Bacteriol.

&lt;304&gt; 175

&lt;305&gt; 5

&lt;306&gt; 1325-1336

&lt;307&gt; 1993

&lt;400&gt; 1

atg	agt	aaa	ccc	att	gtg	atg	gaa	cgc	ggt	gtt	aaa	tac	cgc	gat	gcc	48
Met	Ser	Lys	Pro	Ile	Val	Met	Glu	Arg	Gly	Val	Lys	Tyr	Arg	Asp	Ala	
1				5					10					15		

gat	aag	atg	gcc	ctt	atc	ccg	gtt	aaa	aac	gtg	gca	aca	gag	cgc	gaa	96
Asp	Lys	Met	Ala	Leu	Ile	Pro	Val	Lys	Asn	Val	Ala	Thr	Glu	Arg	Glu	
			20					25					30			

gcc	ctg	ctg	cgc	aag	ccg	gaa	tgg	atg	aaa	atc	aag	ctt	cca	gcg	gac	144
Ala	Leu	Leu	Arg	Lys	Pro	Glu	Trp	Met	Lys	Ile	Lys	Leu	Pro	Ala	Asp	
		35					40					45				

tct	aca	cgt	atc	cag	ggc	atc	aaa	gcc	gca	atg	cgc	aaa	aat	ggc	ctg	192
Ser	Thr	Arg	Ile	Gln	Gly	Ile	Lys	Ala	Ala	Met	Arg	Lys	Asn	Gly	Leu	
	50					55				60						

cat	tct	gtc	tgc	gag	gaa	gcc	tcc	tgc	cct	aac	ctg	gcg	gaa	tgc	ttc	240
His	Ser	Val	Cys	Glu	Ala	Ser	Cys	Pro	Asn	Leu	Ala	Glu	Cys	Phe		
65				70				75						80		

aac	cac	ggc	aca	gca	acg	ttt	atg	atc	ctc	ggc	gct	att	tgt	acc	cgc	288
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

# DE 102 35 270 A1 2004.02.12

Asn	His	Gly	Thr	Ala	Thr	Phe	Met	Ile	Leu	Gly	Ala	Ile	Cys	Thr	Arg		
				85					90					95			
cgt	tgt	ccg	ttc	tgt	gat	gtt	gcc	cac	ggg	cgc	ccg	gta	gct	cct	gat	336	
Arg	Cys	Pro	Phe	Cys	Asp	Val	Ala	His	Gly	Arg	Pro	Val	Ala	Pro	Asp		
			100					105					110				
gcc	aat	gaa	cca	gtg	aaa	ctg	gcg	cag	acc	att	gcc	gat	atg	gcg	ctg	384	
Ala	Asn	Glu	Pro	Val	Lys	Leu	Ala	Gln	Thr	Ile	Ala	Asp	Met	Ala	Leu		
		115					120					125					
cgt	tat	gtg	gtt	atc	acc	tcc	gtt	gac	cgt	gat	gac	ctg	cgc	gat	ggc	432	
Arg	Tyr	Val	Val	Ile	Thr	Ser	Val	Asp	Arg	Asp	Asp	Leu	Arg	Asp	Gly		
	130					135					140						
ggg	gcc	cag	cac	ttt	gcg	gat	tgc	att	act	gcc	att	cgg	gaa	aaa	agc	480	
Gly	Ala	Gln	His	Phe	Ala	Asp	Cys	Ile	Thr	Ala	Ile	Arg	Glu	Lys	Ser		
145					150					155					160		
ccg	caa	atc	aaa	att	gaa	act	ctg	gtg	ccg	gat	ttc	cgc	ggg	cgt	atg	528	
Pro	Gln	Ile	Lys	Ile	Glu	Thr	Leu	Val	Pro	Asp	Phe	Arg	Gly	Arg	Met		
			165					170					175				
gat	cgt	gct	ctg	gat	att	ctg	act	gca	acg	cca	cca	gat	gtg	ttc	aac	576	
Asp	Arg	Ala	Leu	Asp	Ile	Leu	Thr	Ala	Thr	Pro	Pro	Asp	Val	Phe	Asn		
			180					185					190				
cat	aac	ctg	gaa	aac	gta	ccg	cgt	att	tac	cgt	cag	gta	cgg	cct	ggg	624	
His	Asn	Leu	Glu	Asn	Val	Pro	Arg	Ile	Tyr	Arg	Gln	Val	Arg	Pro	Gly		
	195					200						205					
gca	gat	tac	aac	tgg	tcg	ctg	aag	ctg	ctg	gaa	cgc	ttt	aaa	gaa	gcg	672	
Ala	Asp	Tyr	Asn	Trp	Ser	Leu	Lys	Leu	Leu	Glu	Arg	Phe	Lys	Glu	Ala		
	210					215					220						
cat	ccg	gaa	atc	ccg	acc	aag	tct	ggg	ctg	atg	gtg	gga	ctg	ggg	gaa	720	
His	Pro	Glu	Ile	Pro	Thr	Lys	Ser	Gly	Leu	Met	Val	Gly	Leu	Gly	Glu		
	225				230				235						240		
acc	aat	gaa	gaa	att	att	gag	gta	atg	cgc	gac	ctg	cgc	cgt	cat	ggg	768	
Thr	Asn	Glu	Glu	Ile	Ile	Glu	Val	Met	Arg	Asp	Leu	Arg	Arg	His	Gly		
			245					250						255			
gtg	acg	atg	tta	acg	ctg	ggg	caa	tat	ttg	cag	cca	agc	cgc	cat	cac	816	
Val	Thr	Met	Leu	Thr	Leu	Gly	Gln	Tyr	Leu	Gln	Pro	Ser	Arg	His	His		
			260				265						270				
ctg	ccg	gtt	caa	cgt	tac	gtt	agc	ccg	gat	gag	ttc	gac	gaa	atg	aaa	864	
Leu	Pro	Val	Gln	Arg	Tyr	Val	Ser	Pro	Asp	Glu	Phe	Asp	Glu	Met	Lys		
		275				280						285					
gcc	gaa	gcg	ctg	gcg	atg	ggc	ttt	acc	cat	gct	gca	tgc	ggg	ccg	ttt	912	
Ala	Glu	Ala	Leu	Ala	Met	Gly	Phe	Thr	His	Ala	Ala	Cys	Gly	Pro	Phe		
	290					295					300						
gtc	cgc	tct	tct	tac	cac	gcc	gat	ttg	cag	gcg	aaa	ggg	atg	gaa	gtt	960	
Val	Arg	Ser	Ser	Tyr	His	Ala	Asp	Leu	Gln	Ala	Lys	Gly	Met	Glu	Val		
	305				310					315					320		
aag	taa															966	

# DE 102 35 270 A1 2004.02.12

Lys

<210> 2  
 <211> 321  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli

<400> 2  
 Met Ser Lys Pro Ile Val Met Glu Arg Gly Val Lys Tyr Arg Asp Ala  
 1 5 10 15  
 Asp Lys Met Ala Leu Ile Pro Val Lys Asn Val Ala Thr Glu Arg Glu  
 20 25 30  
 Ala Leu Leu Arg Lys Pro Glu Trp Met Lys Ile Lys Leu Pro Ala Asp  
 35 40 45  
 Ser Thr Arg Ile Gln Gly Ile Lys Ala Ala Met Arg Lys Asn Gly Leu  
 50 55 60  
 His Ser Val Cys Glu Glu Ala Ser Cys Pro Asn Leu Ala Glu Cys Phe  
 65 70 75 80  
 Asn His Gly Thr Ala Thr Phe Met Ile Leu Gly Ala Ile Cys Thr Arg  
 85 90 95  
 Arg Cys Pro Phe Cys Asp Val Ala His Gly Arg Pro Val Ala Pro Asp  
 100 105 110  
 Ala Asn Glu Pro Val Lys Leu Ala Gln Thr Ile Ala Asp Met Ala Leu  
 115 120 125  
 Arg Tyr Val Val Ile Thr Ser Val Asp Arg Asp Asp Leu Arg Asp Gly  
 130 135 140  
 Gly Ala Gln His Phe Ala Asp Cys Ile Thr Ala Ile Arg Glu Lys Ser  
 145 150 155 160  
 Pro Gln Ile Lys Ile Glu Thr Leu Val Pro Asp Phe Arg Gly Arg Met  
 165 170 175  
 Asp Arg Ala Leu Asp Ile Leu Thr Ala Thr Pro Pro Asp Val Phe Asn  
 180 185 190  
 His Asn Leu Glu Asn Val Pro Arg Ile Tyr Arg Gln Val Arg Pro Gly  
 195 200 205  
 Ala Asp Tyr Asn Trp Ser Leu Lys Leu Leu Glu Arg Phe Lys Glu Ala  
 210 215 220  
 His Pro Glu Ile Pro Thr Lys Ser Gly Leu Met Val Gly Leu Gly Glu  
 225 230 235 240  
 Thr Asn Glu Glu Ile Ile Glu Val Met Arg Asp Leu Arg Arg His Gly  
 245 250 255  
 Val Thr Met Leu Thr Leu Gly Gln Tyr Leu Gln Pro Ser Arg His His  
 260 265 270

Leu Pro Val Gln Arg Tyr Val Ser Pro Asp Glu Phe Asp Glu Met Lys  
 275 280 285

Ala Glu Ala Leu Ala Met Gly Phe Thr His Ala Ala Cys Gly Pro Phe  
 290 295 300

Val Arg Ser Ser Tyr His Ala Asp Leu Gln Ala Lys Gly Met Glu Val  
 305 310 315 320

Lys

<210> 3  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Oligonukleotid  
 lipAS1

<400> 3  
 gatcgaggtc tcgaatgagt aaaccattg tgatg 35

<210> 4  
 <211> 38  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Oligonukleotid  
 lipAS2

<400> 4  
 gatcgaggtc tcggcgctct taacttccat ccctttcg 38

<210> 5  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Strep-TagII  
 Sequenz

<400> 5  
 Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys  
 1 5 10

**Patentansprüche**

1. Zelle, die enantiomerenreine R- $\alpha$ -Liponsäure in ein Kulturmedium sekretiert, **dadurch gekennzeichnet**, dass sie ein Liponsäure-Synthase-Gen (lipA-Gen) überexprimiert.
2. Zelle nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie das Liponsäure-Synthase-Gen im Vergleich zu einer Wildtyp-Zelle aus der das Liponsäure-Synthase-Gen gewonnen wurde, mindestens um den Faktor 2, bevorzugt mindestens um den Faktor 5 vermehrt exprimiert.
3. Zelle nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Liponsäure-Synthase-Gen um ein Gen mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 oder eine funktionelle Variante dieses Gens handelt.
4. Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Kopienzahl des lipA-Gens in der Zelle erhöht ist oder die Expression des lipA-Gens, vorzugsweise durch einen geeigneten Promotor, gesteigert ist.
5. Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Liponsäure-Synthase-Gen für ein Protein umfassend die Sequenz ID NO: 2 oder funktionelle Varianten mit einer Sequenzhomologie zu SEQ ID NO: 2 größer 40 %, codiert.
6. Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um einen Mikroorganismus, wie zum Beispiel einen Hefe- oder Bakterienstamm handelt.
7. Zelle nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um einen Bakterienstamm aus der Familie der Enterobacteriaceae, ganz besonders bevorzugt um einen Stamm der Art Escherichia coli handelt.
8. Plasmid dadurch gekennzeichnet, dass es ein lipA-Gen unter funktioneller Kontrolle eines Promotors enthält.
9. Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen Zelle, dadurch gekennzeichnet, dass in eine Ausgangszelle ein erfindungsgemäßes Plasmid eingebracht wird.
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass als Ausgangszelle eine Zelle eines pro- oder eukaryontischen Organismus eingesetzt wird, die in der Lage ist, R- $\alpha$ -Liponsäure zu synthetisieren, die einem rekombinanten Verfahren zugänglich ist und die durch Fermentation kultivierbar ist.
11. Verfahren zur Herstellung enantiomerenreiner R- $\alpha$ -Liponsäure, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass eine Zelle gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 in einem Kulturmedium kultiviert wird, wobei die Zelle enantiomerenreine R- $\alpha$ -Liponsäure in freier Form in das Kulturmedium ausscheidet und die enantiomerenreine R- $\alpha$ -Liponsäure von dem Kulturmedium abgetrennt wird.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Abtrennung der enantiomerenreinen R- $\alpha$ -Liponsäure durch Zentrifugation des Kulturmediums und anschließende Extraktion oder Präzipitation der R- $\alpha$ -Liponsäure erfolgt.
13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, dass eine Inkubation der Zellen in einem Minimalsalzmedium als Kulturmedium unter aeroben Kultivierungsbedingungen über einen Zeitraum von 16 – 150 h und im Bereich der für die jeweiligen Zellen optimalen Wachstumstemperatur erfolgt.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

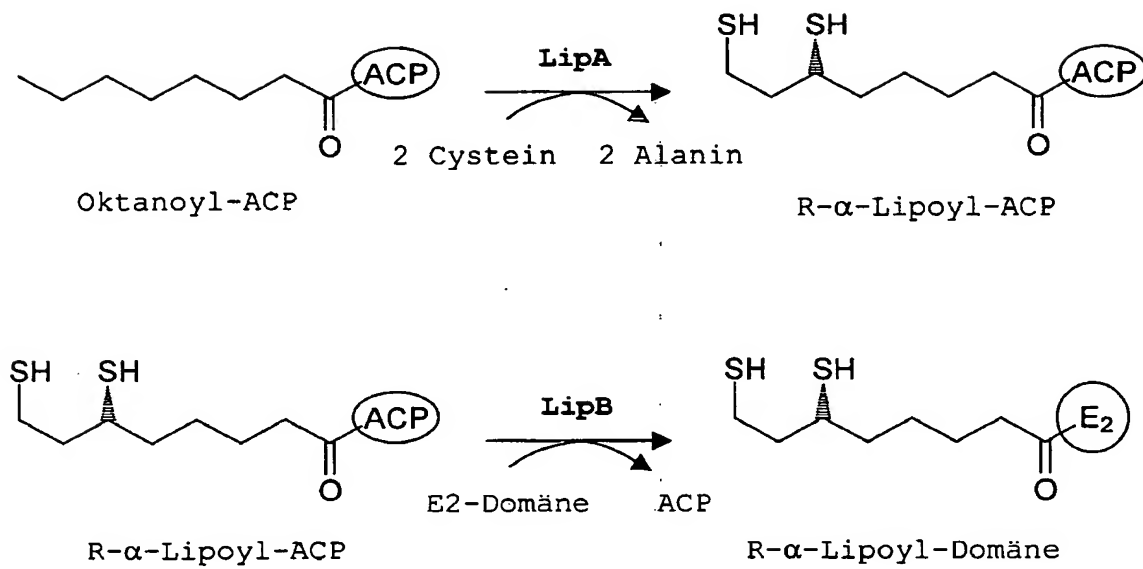
Fig. 1: Synthese der R- $\alpha$ -Liponsäure in *E. coli*

Fig. 2: Vektor pASK-IBA3-lipA

